

200500750 A

別添1

厚生労働科学研究研究費補助金

免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業

スギ花粉・ダニ由来のアレルゲンの分析と診断・治療への応用に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 安枝 浩

平成18年(2006)年3月

目次

I. 総括研究報告

スギ花粉・ダニ由来のアレルゲンの分析と診断・治療への応用に
関する研究 1
安枝 浩

II. 分担研究報告

1. スギ花粉主要アレルゲンのアイソフォームの解析 6
安枝 浩

2. スギ花粉アレルゲン遺伝子組換え乳酸菌を用いたスギ花粉症
に対する新規免疫療法の開発 9
阪口 雅弘

3. 組換えダニ主要アレルゲン Der p 1 及び Der f 1 の、ヒトタン
パク質を基質とした切断活性、ヒトケラチノサイト活性化
能、及びマウスにおける IgE 誘導活性13
高井 敏朗

4. プロテオーム解析によるスギ花粉・ダニアレルゲンの分子群
の全容解明、アレルゲンデータベースの構築16
小埜 和久

5. スギ花粉症に対する「食べるワクチン」の開発20
斎藤 三郎

6. スギ花粉、ダニによるアレルギーを自然発症したイヌを用い
た新規免疫療法の開発22
辻本 元

7. スギ花粉症患者における Cry j 1 に対する血清中 IgE 抗体の
親和性の変動に関する研究：減感作療法による3年間の変動
と治療効果評価の有用性について26
三田 晴久

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）
総括研究報告書

スギ花粉・ダニ由来のアレルゲンの分析と診断・治療への応用に関する研究

主任研究者 安枝 浩 独立行政法人国立病院機構相模原病院臨床研究センター 室長

研究要旨

わが国のアレルギー疾患における最大の原因アレルゲンは室外のスギ花粉と室内のダニである。本研究班は、これらのスギ花粉、およびダニのアレルゲンの分子レベルにおける構造や機能の解析を基にした新たな診断薬や治療薬の開発、ならびにスギ花粉症、ダニアレルギーの根治的治療を目標とした新規抗原特異的治療法の確立を目的として組織された。平成 17 年度には以下の研究成果が得られた。

アレルゲンの解析に関しては、スギ花粉から 2 種類の新規アレルゲンをクローニングし、その活性型組換え体を調製した。ダニグループ 1 アレルゲン Der f 1/Der p 1 の組換型は天然型と同等の構造およびアレルゲン活性を保持しているだけでなく、プロテアーゼ活性に依存した細胞刺激活性や IgE/Th2 誘導活性を保持していることを明らかにした。特定のモノクローナル抗体との反応性を欠失したスギ花粉主要アレルゲン Cry j 1 のアイソフォームの存在は、現行のスギ花粉アレルゲン標準化に影響を及ぼす可能性がある。その可能性を排除するために、アイソフォームの存在割合によって影響を受けない力価設定用 ELISA を構築した。Cry j 1 に対する IgE 抗体の親和性は花粉飛散量に依存した年次変動を繰り返すが、減感作治療はそのような花粉曝露にともなう親和性亢進を抑制することを見いだした。スギ花粉症、ダニアレルギーの新たな抗原特異的治療薬として、スギ花粉アレルゲン遺伝子組換え乳酸菌、スギ花粉アレルゲン発現組換え米による「食べるワクチン」、ダニアレルゲン DNA ワクチンの開発を進めた。遺伝子組換え乳酸菌では、Cry j 1 の全長の約半分の断片と Listeriolysin O (LLO) の融合蛋白として発現する組換え乳酸菌の作製に成功した。「食べるワクチン」では、経口摂取 6 ヶ月後でも経口トランスは維持されていることがマウスにおいて確認され、ダニアレルゲン DNA ワクチンでは、Der f 2, および新規アレルゲン Z1 の DNA ワクチンはイヌに対する投与試験で安全性、実験的感作に対する有効性が確認された。

分担研究者

阪口雅弘 (独) 理化学研究所免疫アレルギー総合科学研究センター チームリーダー
高井敏朗 順天堂大学医学部アトピー疾患研究センター 講師
小笠和久 広島大学大学院先端物質科学研究科 教授
斎藤三郎 東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所 助教授
辻本 元 東京大学大学院農学生命科学研究科 教授
三田晴久 (独) 国立病院機構相模原病院臨床研究センター 室長

レルゲンは室外のスギ花粉と室内のヒョウヒダニ（以下ダニ）である。スギ花粉症はわが国の国民病ともいわれている疾患で、最近の調査では全人口のおよそ 20 % が罹患している。一方、ダニについては、小児気管支喘息の原因アレルゲンの 80 - 90 % はダニであり、成人のアトピー型気管支喘息においても大半の患者はダニに感作されている。しかもスギ花粉症や小児気管支喘息などのアレルギー疾患は、近年増加の一途をたどっており、スギ花粉、ダニを原因とするアレルギー疾患の新規治療法を確立することは社会的急務でもある。

本研究においては、これらの疾患発症の直接の原因となるスギ花粉、ダニのアレルゲンを同定、天然型アレルゲンの精製や組換え型アレルゲンの作製を行い、それらのアレルゲンの構造や機能を分子レベルで解析して、得られた成果をアレルゲン

A. 研究目的

わが国のアレルギー疾患における最大の原因ア

エキスの品質改善，標準化，新たな診断薬，治療薬の開発に応用する。さらに，本研究では，スギ花粉症，ダニアレルギーの根治的治療を目標とした新たなアレルゲン特異的免疫療法の開発，および免疫療法の有効性を客観的に評価できる指標の開発を行い，それらの臨床応用を目指す。

B. 研究方法

1. アレルゲンの同定，解析に関する研究（小埜・高井・安枝）

スギ花粉，ダニの抽出物を二次元電気泳動で展開し，患者血清を用いたイムノブロットで各スポットのIgE抗体反応性を検出，比較した。陽性頻度の高いスポットはその一次配列をTOF-MSで同定，その情報をもとにcDNAをクローニングした。組換体をバキュロウイルス-昆虫細胞分泌発現系により作製し，そのIgE結合活性および酵素活性を評価した。

プロテアーゼ活性を保持した組換型のダニ主要アレルゲンDer f 1, Der p 1を一昨年度に確立した方法で調製し，そのプロテアーゼ活性によるヒトタンパク質（CD23, CD25, α 1-antitrypsin）切断，ヒトケラチノサイト活性化，およびマウスにおけるIgE誘導能を調べた。

スギ花粉主要アレルゲンCry j 1に対するモノクローナル抗体（mAb）を新たに36種類作製し，スギ精英樹（スギ造林事業における種苗生産のために育成，継代されている品種）花粉抽出液中Cry j 1の各mAbに対する反応性を調べることにより新たなアイソフォームを探索した。精英樹花粉からアイソフォーム標品を単離し，IgE抗体との反応性を一般型Cry j 1と比較した。力価測定用のsandwich ELISAは，さまざまなmAb同士を組み合わせた系について，各種スギ花粉抽出液との反応性の検討を行い，その中から力価測定用として適切なものを選択した。

2. アレルゲンに対するIgE抗体の親和性測定（三田）

同意が得られたスギ花粉症患者から3年間にわたり（平成15, 16, 17年）スギ花粉の飛散期に末梢静脈血を採取し，血漿を用いて抗体値（total IgE, Cry j 1に対するIgE抗体, IgG抗体, IgG4抗体）とCry j 1に対するIgE抗体の親和性を測定し，さらに洗浄白血球を分離してCry j 1によ

るヒスタミン遊離試験を行った。平成17年度の時点での未治療患者，減感作5年未満，5年以上継続患者の3群に分けて各種パラメーターについての群間比較を行った。

3. 治療法に関する研究（阪口・斎藤・辻本）

Cry j 1 T細胞エピトープ・ペプチド(p227-290)を含むCry j 1蛋白(p158-329)の遺伝子とListeriolysin O (LLO)の溶血活性のあるDomain 4を除いたDomain 1-3遺伝子を発現ベクターであるpLPD4に組み込み，*L. casei*にトランスフェクトし，スギ花粉アレルゲン遺伝子組換乳酸菌（Cry j 1 *L. casei*）を作製した。その蛋白発現を調べるために菌体を溶解後，抗LLO抗体を用いたウエスタンブロット法でLLO-Cry j 1の発現を調べた。また，Cry j 1のプライマーを使ってCry j 1のmRNAの存在も調べた。

「食べるワクチン」による経口トレランス誘導能は，経口摂取させるペプチド発現米の量を調節して，その後の免疫応答性を検討した。経口トレランスの持続期間は，1ヶ月間経口摂取させ，6ヶ月後の免疫応答能を解析する系で調べた。7連結ペプチド（7 crp）に対するモノクローナル抗体を作製し，アフィニティカラムによりペプチド発現米からペプチドを精製できるか検討した。

イヌのアトピー性皮膚炎（AD）における*D. farinae* (DF)の主要アレルゲンと考えられる約170kDaのアレルゲン（Z1）のクローニングを実施した。次いで，組換体Z1に対する抗体のカラムによって天然型Z1蛋白を単離し，ADに罹患したイヌの血清との反応性を検討した。Der f 2 cDNAおよびZ1 cDNAをプラスミド発現ベクターに組み込み，DNAワクチンを作製した。予定臨床投与量（0.5 mg/dog）およびその3倍量を実験用ビーグル犬に投与してその安全性を評価した。また，DNAワクチン投与後にDer f 2による実験的感作を行いその有効性を検討した。

C. 研究結果

1. アレルゲンの同定，解析に関する研究

イムノブロットで高いIgE抗体反応頻度を示した2種類の新規スギ花粉アレルゲン（CPA39, CPA63）は，それぞれ β -1,3-glucanase および aspartyl protease/nucleoid DNA binding protein であると同定された。バキュロウイルス-

昆虫細胞による分泌発現・精製系で得られた組換え型 CPA39, CPA63 は共に IgE 結合活性を示し、CPA39 は β -1,3-glucanase 活性も有していた。

組換え型 Der f 1, Der p 1 はヒト CD23, CD25 および α 1-antitrypsin を切断した。免疫マウスにおいては組換え型 Der f 1, Der p 1 は天然型と同等の IgE を誘導した。また、組換え型 Der f 1, Der p 1 刺激によりヒトケラチノサイト培養上清中の IL-8 が上昇し、システインプロテアーゼインヒビターの添加によりこれは抑制された。

今回調べた 58 種類のスギ精英樹からは新規の Cry j 1 アイソフォームをホモで保有している個体は見いだせなかった。これまでに同定した 2 種類の Cry j 1 アイソフォームはヒト IgE 抗体との反応性には一般型と差が見られなかった。一次抗体に J1B07 と新規の J1B47 を等量ブレンドしたもの、二次抗体に J1B01 という組み合わせの ELISA がアイソフォームの影響を受けにくく、スギ花粉標準化における力価測定用 ELISA として最適であった。

2. アレルゲンに対する IgE 抗体の親和性測定

Cry j 1 に対する IgE 抗体の親和性は、花粉の飛散量に依存する K_D 値の増減が観察されたが、花粉曝露にともなう親和性の亢進は 5 年以上の減感作群ではみられなくなった。同一血清 ($n=11$) で比較した場合、IgG4 抗体の親和性 (K_D : 677 pM) は IgE 抗体の親和性 (13.5 pM) と比べて有意に弱かった。

3. 治療法に関する研究

スギ花粉アレルゲン遺伝子組換え乳酸菌において、LLO-Cry j 1 が発現していることが抗 LLO 抗体を用いたウエスタンブロット法で確認され、その分子量は組み込んだ LLO と Cry j 1 の分子量を加えたものに一致していた。また、Cry j 1 の mRNA が発現していることも確認された。

経口トレランスの誘導に必要な量は、7 crp に換算すると、1 日当たり 100 マイクログラム以上であった。経口トレランスは、経口摂取 6 ヶ月後でも減弱してはいるが維持されていることが観察された。アフィニティカラムを用いると、ペプチド発現米の抽出液からペプチドを精製できることが確認できた。

AD に罹患したイヌの血中には天然型 Z1 に対する IgE 抗体が検出され、Z1 がイヌにおける新

規ダニアレルゲンであることが証明された。また、AD のイヌの 70 % に Der f 2 と Z1 の両方、または一方に対する IgE 抗体が検出された。Der f 2 DNA ワクチン、Z1 DNA ワクチンを予定臨床投与量の 3 倍量投与してもイヌに異常は認められなかった。Der f 2 DNA ワクチン投与後に実験的感作をした群では、ワクチン非投与後に感作した群に比べて Der f 2 特異的 IgE 抗体の上昇が抑えられていた。

D. 考察

新規のスギ花粉アレルゲンとして β -1,3-glucanase ホモログである CPA39, aspartyl protease 様分子である CPA63 を同定した。二次元電気泳動マップで高い IgE 反応頻度を示すこれら以外の新規アレルゲンの cDNA クローニングも完了しつつあり、主要なスギ花粉アレルゲノームの全貌を明らかにすることができた。

組換え型 Der f 1, Der p 1 は天然型と同等の構造および IgE 結合能/アレルゲン活性を保持しており、診断や治療における標準化抗原として有用である。さらに、プロテアーゼ活性に依存した細胞刺激活性や IgE/Th2 誘導活性を保持しているので、機能と疾患の関連における作用点の解析研究においても有用である。今後はそれらの作用点を標的とした改変アレルゲンによる治療法の開発へと展開していく必要がある。

スギ精英樹から新たな Cry j 1 アイソフォームを探索したが、自然界に高い割合で存在する第 3 のアイソフォームは見いだされなかった。これまでに同定した 2 種類のアイソフォームは IgE 抗体との反応性に一般型と差はなく、花粉症の症状そのものには影響しない。しかし、アイソフォームの存在は現行の標準化には影響を及ぼす。この問題を解決すべく新たな力価測定用 ELISA の系を組み立てた。

Cry j 1 に対する IgE 抗体の親和性は花粉飛散期にその飛散量に依存して親和性が増大するという変動を繰り返した。しかし、減感作長期間継続例ではそのような花粉曝露にともなう親和性亢進は見られなくなっていた。すなわち、IgE 抗体の親和性は減感作治療の新しいパラメーターとなる可能性が示唆された。

乳酸菌の強い Th1 誘導作用を利用したアレルゲ

ン組換乳酸菌ワクチンは、製造コストも低く、経口投与で行うことのできる安全性の高い治療用ワクチンとなりうる。本研究において LLO-Cry j1 の発現が確認された。今後は IgE 抗体抑制能など本ワクチンの有効性についての動物モデルでの評価が必要である。

スギ花粉アレルゲンのペプチド発現米の経口摂取により、予防的にも治療的にも経口トレランスが誘導され、食べるワクチンは花粉症に対し有効な免疫療法となることが示唆された。経口トレランスの有効量、持続期間、あるいはそのメカニズムの詳細については今後更に解析する必要がある。

本研究で開発した 2 種類のダニ DNA ワクチンは、その安全性試験において問題のないことが確認され、ワクチンの予防的投与によって IgE 抗体の産生を抑制することが示された。ダニに感作され AD を罹患したイヌを対象にした臨床的評価が今後の課題である。

E. 結論

スギ花粉・ダニ由来のアレルゲンの分析と、その診断・治療への応用に関して多くの成果が得られた。これらの成果をスギ花粉症、ダニアレルギーに対する特異的治療法の実用化に向けて展開していくことが今後の課題である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kato T, Takai T, Mitsuishi K, Okumura K, Ogawa H. Cystatin A inhibits IL-8 production by keratinocytes stimulated with Der p 1 and Der f 1: Biochemical skinbarrier against mite proteases. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 169-176.
- 2) Nakazawa T, Takai T, Hatanaka H, Mizuuchi E, Nagamune T, Okumura K, Ogawa H. Multiple-mutation at a potential ligand-binding region decreased allergenicity of a mite allergen Der f 2 without disrupting global structure. *FEBS Lett* 2005; 579: 1988-1994.

- 3) Takai T, Kato T, Ota M, Yasueda H, Kuhara T, Okumura K, Ogawa H. Recombinant Der p 1 and Der f 1 with in vitro enzymatic activity to cleave human CD23, CD25, and α 1-antitrypsin, and in vivo IgE-eliciting activity in mice. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 137: 194-200.
- 4) Takai T, Takaoka M, Yasueda H, Okumura K, Ogawa H. Dilution-method to refold bacterially expressed recombinant Der f 2 and Der p 2 to exhibit the secondary structure and histamine-releasing activity of natural allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 137: 1-8.
- 5) Takai T, Mizuuchi E, Kikuchi Y, Nagamune T, Okumura K, Ogawa H. Glycosylation of recombinant proforms of major mite allergens Der p 1 and Der f 1 decelerates the speed of maturation. *Int Arch Allergy Immunol* 2006; 139: 181-187.
- 6) Ichikawa S, Takai T, Inoue T, Yuuki T, Okumura Y, Ogura K, Inagaki F, Hatanaka H. NMR study on the major mite allergen Der f 2: Its refined tertiary structure, epitopes for monoclonal antibodies and characteristics shared by ML protein group members. *J Biochem* 2005; 137:255-263.
- 7) Ohmori K, Sakaguchi M, Kaburagi Y, Maeda S, Masuda K, Ohno A, Tsujimoto H. A descriptive study of 85 dogs with suspected allergic reactions after vaccination in Japan. *Vet Rec* 2005; 156: 87-88.
- 8) Miyazawa H, Sakaguchi M, Yasueda H, Saito S, Tanaka K, Nagata K, Inouye S. Non-IgE,-IgG4 antibody to Japanese cedar pollen allergens: Comparison of its prevalence and titers between pollinosis patients and non-patients. *Allergol Int* 2005; 54: 159-166.
- 9) Ohmori K, Sakaguchi M, Maeda S, Masuda K, Ohno K, Kaburagi Y, Kurata K, DeBoer DJ, Tsujimoto H. IgE reactivity to vaccine components in dogs that developed immediate-type allergic after vaccination. *Vet*

Immunol Immunopathol 2005; 104: 249-256.

- 10) Murasugi T, Nakagami Y, Yoshitomi T, Hirahara K, Yamashita M, Taniguchi Y, Sakaguchi M, Ito K. Oral administration of a T cell epitope inhibits symptoms and reactions of allergic rhinitis in Japanese cedar pollen allergen-sensitized mice. *Eur J Pharmacol* 2005; 510, 143-148.
- 11) Olsen D, Jiang J, Chang R, Duffy R, Sakaguchi M, Leigh S, Lundgard R, Ju J, Buschman F, Truong-Le V, Plarek J. Expression and characterization of a low molecular weight recombinant human gelatin. *Protein Expr Purif* 2005; 40: 346-357.
- 12) Futamura N, Tani N, Tsumura Y, Mukai Y, Nakajima N, Sakaguchi M, Shinohara K. Characterization of genes for novel thaumatin-like proteins in *Cryptomeria japonica*. *Tree Physiol* 2006; 26: 51-62.
- 13) Takagi H, Saito S, Yang L et al. Oral immunotherapy against a pollen allergy using a seed-based peptide vaccine. *Plant Biotechnol J* 2005; 3: 521-533.
- 14) Maeda S, Tsukui T, Saze K, Masuda K, Ohno K, Tsujimoto H, Iwabuchi S. Production of a monoclonal antibody to canine thymus and activation-regulated chemokine (TARC) and detection of TARC in lesional skin from dogs with atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; 103: 83-92.
- 15) Yasuda N, Tsukui T, Masuda K, Kawarai S, Ohmori K, Maeda S, Tsujimoto H. Cloning of cDNA encoding canine endothelin receptors and their expression in normal tissues. *J Vet Med Sci* 2005; 67: 1075-1079.

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）
分担研究報告書

スギ花粉主要アレルゲンのアイソフォームの解析

分担研究者 安枝 浩 独立行政法人国立病院機構相模原病院臨床研究センター 室長

研究要旨

スギ花粉主要アレルゲン Cry j 1 のアイソフォームを解析した。スギ精英樹から見いだされた 2 種類の Cry j 1 アイソフォームは、いずれも特定の抗 Cry j 1 モノクローナル抗体 (mAb) との反応性を欠失していたが、ヒト IgE 抗体に対しては一般型 Cry j 1 と同じように反応した。新たに作製した mAb を用いて精英樹 58 個体の花粉を対象に、これまでに見いだした 2 種類以外のアイソフォームを探索したが、存在割合の高い新規アイソフォームは見いだせなかった。N 末端から 352 番目のアミノ酸が Arg から His に置換したアイソフォームは自然界に存在する Cry j 1 のおよそ 20% を占める。現行のスギ花粉アレルゲン標準化における力価測定用 ELISA では、このアイソフォームと反応しない mAb を用いるため、アレルゲン標準品、アレルゲンエキス中のこのアイソフォームの存在割合によって力価の測定値に誤差が生じる。この問題を解決するために、アイソフォームの存在割合によって影響を受けない新たな力価測定用 ELISA を組み立てた。

研究協力者

福田陽子 ((独) 林木育種センター)
齋藤明美, 石井豊太 ((独) 国立病院機構相模原病院臨床研究センター)

A. 研究目的

スギ花粉主要アレルゲン Cry j 1 のアイソフォームの解析をすすめている。これまでにスギ精英樹 (木材としての優れた特性を持ち、造林事業における種苗生産のために、育成、継代されている品種) から、特定のモノクローナル抗体 (mAb) との反応性を欠失した 2 種類のアイソフォームを見だし、そのうちの N 末端から 352 番目のアミノ酸が Arg から His に置換した 352His は、ヒト IgE 抗体には一般型 Cry j 1 と同様に反応するが、自然界に無視できないレベルで存在し、現行のスギ花粉標準化で用いられている力価測定用 ELISA に影響を及ぼす可能性があることを示した。今年度は、第 2 のアイソフォーム (55 番目が Pro から Leu に置換した 55Leu) のヒト IgE 抗体に対する反応性の解析、および新たに作製した mAb を用いて、新規のアイソフォームの探索を行うとともに、スギ花粉アレルゲン標準化にアイソフォームが影響を及ぼす可能性を排除するために、

アイソフォームの存在割合によって影響を受けない力価測定用 ELISA の系を構築した。

B. 研究方法

Cry j 1 に対する mAb を新たに 36 種類作製し、エピトープマッピングによりグループ分けをした。各グループの代表的な mAb と新たな精英樹 58 個体の花粉抽出液中 Cry j 1 との反応性を調べることにより新たなアイソフォームを探索した。

アイソフォーム 55Leu 標品の単離は、55Leu をヘテロで保有する精英樹の花から Cry j 1 を精製し、55Leu と反応しない mAb (J1B07) で一般型 Cry j 1 を徹底的に吸収することにより調製した。IgE 抗体との反応性を一般型 Cry j 1 と比較した。IgE 抗体に対する反応性の比較は、paper disk を固相とする RAST 法と、マイクロプレートウェルを固相とする ELISA inhibition 法で行った。

標準化に用いる sandwich ELISA は、さまざまな mAb 同士を組み合わせた系やいくつかの mAb をブレンドした系について、各種スギ花粉抽出液との反応性の検討を行い、その中から力価測定用として適切なものを選択した。

「スギ花粉エキス標準品」は日本アレルギー学

会から、市販の「標準化アレルギー治療エキス」の6ロットは鳥居薬品（株）から提供を受けた。

C. 研究結果

新たに作製した36種類のmAbを用いて行ったCry j 1のエピトープマッピングの結果、36種類の新規mAbは認識するエピトープの違いにより6グループに大別された。各グループの代表的なmAbと従来のmAb 2種（J1B01, J1B07）の合計8種類のmAbを用いて、精英樹58個体の花粉抽出液中Cry j 1の反応性を調べた。しかし、特定のmAbとの反応性を完全に欠失している精英樹、すなわち新たなアイソフォームをホモで保有している可能性のある精英樹は58個体の中からは見いだせなかった。反応性がおよそ半分に減弱している精英樹、すなわち特定のmAbと反応しないアイソフォームをヘテロで保有している可能性のある精英樹はいくつか見いだされたがその頻度は低かった。

55番目がProからLeuに置換したアイソフォーム55LeuのヒトIgE抗体に対する反応性をdirect RASTとELISA inhibition testで評価した。一般型Cry j 1と55Leuに対する患者血清中のIgE抗体価はほぼ完全に一致し、患者プール血清を用いたELISA inhibition testにおいても両者の活性は同一であり（図1）、昨年度報告した352Hisと同様に、55LeuもヒトIgE抗体との反応性には一般型Cry j 1と差は見られなかった。

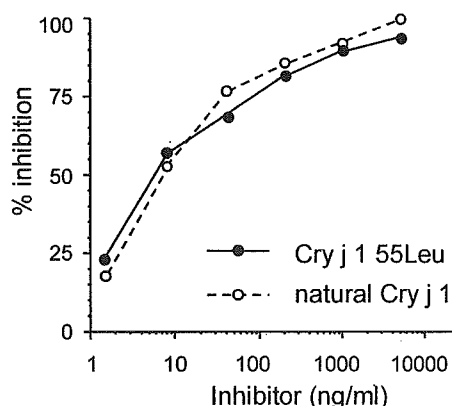


図1 ELISA inhibition test で評価したCry j 1 55LeuのヒトIgE抗体に対する反応性。natural Cry j 1はスギ林の複数の個体から採取した花粉由来のCry j 1

昨年度示したように、352Hisのタンパク質レベルにおける存在割合は、352番目がArgホモの精英樹（鬼泪7号）花粉抽出液をスタンダードにして、一次抗体とビオチン化二次抗体の両方にウサギポリクローナル抗体を用いるELISA (pAb/pAb) と、どちらか一方の抗体に352Hisと反応しないJ1B07を用いるELISA (J1B07/J1B01, J1B07/pAbなど)の測定値から見積もることができる。表1に示したように、自然界に存在するCry j 1のおよそ20%は352Hisアイソフォームであると推定され、しかもスギ林から採集した花粉標品やアレルギーエキスでは、標品ごとにその中に含まれる352Hisの割合は大きく異なっていた。

表1 タンパク質レベルにおけるアイソフォーム352Hisの割合

	ELISA (μg/ml)		352His (%)
	pAb/pAb	J1B07/J1B01	
精英樹花粉			
鬼泪7号(R/R)	20.0	20.0	0
青森2号(H/H)	6.9	< 0.5	> 93
秩父署3号(R/H)	26.1	13.3	49.0
スギ林由来の花粉			
神奈川 (1977)	13.2	9.4	28.5
福島 (1983)	21.2	19.2	9.4
兵庫 (2001)	15.0	9.9	33.9
アレルギーエキス			
日本アレルギー学会標準品	12.8	9.4	26.3
標準化スギ花粉エキス市販品(鳥居薬品)			
SB5J	16.2	13.6	16.0
SB5L 10,000 JAU/ml	17.2	14.4	16.3
SB5T	10.2	8.0	21.6
SB5U	10.8	8.0	25.9
Hollister-Stier			
B4129671 1:20 (W/V)	16.5	< 0.5	> 97
HB87A9123	14.0	1.2	92.5

現行のスギ花粉アレルギー標準化法では、J1B07/J1B01を用いるELISAで、日本アレルギー学会標準品をスタンダードとして用いて測定したときのCry j 1含有量を基にして力価が設定されている。表1に示したように、標準品や各種エキス中の352Hisの存在割合はさまざまである。このために、現行のELISAではCry j 1含有量の

測定値に誤差を生じる。すなわち、352His の割合が標準品のそれよりも低いものでは、わずかではあるが本来の Cry j 1 量よりも高めの値になり、逆に His352 が大半を占めるエキスでは測定値が極端に低くなる(表 2)。そこで、このような誤差を生じない適切な力価測定用 ELISA の系を確立すべく、ELISA に使用する mAb の組み合わせについて検討を加えた。J1B01 と新規の mAb を組み合わせた系、新規 mAb 同士を組み合わせた系、一次抗体、あるいは二次抗体に 2 種類の mAb をブレンドした系などについて検討した結果、一次抗体には J1B07 と新規の J1B47 を等量ブレンドしたもの、二次抗体には J1B01 という組み合わせがアイソフォームの影響を受けにくく、力価測定用 ELISA として最適であった(表 2)。

表2 各種 ELISA で求めたアレルゲンエキス中の Cry j 1 量

アレルゲンエキス	ELISA(μg/ml)		
	pAb/pAb	B07/B01	(B07+B41)/B01*
日本アレルギー学会標準品	12.5	12.5	12.5
標準化スギ花粉エキス(鳥居薬品)			
SB5J	16.4	17.4	17.1
SB5K 10,000 JAU/ml	17.8	20.6	19.0
SB5L	16.5	21.7	19.9
SB5U	11.8	12.1	11.9
Hollister-Stier			
B4129671 1:20 (W/V)	13.6	< 0.5	13.0
HB87A9123	17.6	2.3	15.6
精英樹花粉			
青森2号	6.9	< 0.5	6.6

* : 一次抗体に J1B07 と J1B47 の 1:1 混合物を使用

D. 考察

新たに多種類の mAb を作製し、58 種類の精英樹を対象にして新たなアイソフォームを探索した。352His のように自然界に高い割合で存在する第 3 のアイソフォームは見いだされなかったが、特定の mAb に対する反応性が減弱している精英樹、すなわち新たなアイソフォームをヘテロで保有している可能性のあるものは、その頻度は低いもののいくつか見いだされた。これらについては、今後その Cry j 1 cDNA のクローニングを実施して確認する予定である。これまでに見いだされた 2 種類のアイソフォームはいずれも特定の mAb と

の反応性は欠失していたが、ヒト IgE 抗体との反応性には一般型と差はなく、シラカンバ花粉の主要アレルゲン Bet v 1 で報告されているような hypoallergenic isoform ではなかった。したがってこのようなアイソフォームの存在が花粉症の症状に影響を及ぼすということではなく、構造解析の結果が新たな治療薬の開発へと展開する可能性があるというわけではない。しかし、アイソフォームの存在は現行のスギ花粉アレルゲン標準化には影響を及ぼす。現状では市販の「標準化アレルゲン治療エキス」のアイソフォームの存在割合が標準品のそれと大差がないため、力価設定に大きな問題は生じていないが、将来的に問題が生じる可能性を排除するためには、アイソフォームの影響を受けない ELISA の系を確立することが必要である。2 種類の mAb, J1B07 と J1B47 をブレンドしたものを一次抗体に用いる新しい ELISA はエキス中の 352His の存在割合にほとんど影響を受けない(表 2)。また、多種類の mAb を用いた今年度の検討から、352His のように頻度の高い Cry j 1 の新規アイソフォームが存在する可能性はきわめて低いので、この ELISA を用いる限り標準化における力価測定に問題の生じることはないと考えられる。

E. 結論

特定の mAb との反応性を欠失した Cry j 1 アイソフォームの存在は現行のスギ花粉アレルゲン標準化に影響を及ぼす可能性がある。その可能性を排除するために、アイソフォームの存在割合によって影響を受けない力価設定用 ELISA を構築した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

スギ花粉アレルギー遺伝子組換え乳酸菌を用いたスギ花粉症に対する新規免疫療法の開発

分担研究者 阪口 雅弘 独立行政法人理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター
ワクチンデザイン研究チーム

研究協力者 五十君 静信 国立医薬品食品衛生研究所

スギ花粉症は国民の10%以上が発症していると推定されており、根治的な治療法の開発が急務となっている。本研究では、スギ花粉症に対する新規免疫療法の開発を目的とし、スギ花粉主要アレルゲンである Cry j 1 を発現する乳酸菌 (*Lactobacillus casei*) の作製を試みた。その結果、N末端から 158-329 番目のアミノ酸を含む Cry j 1 を Listeriolysin (LLO) との融合蛋白として発現する組換え乳酸菌の作製に成功した。また、LLO の作用により、乳酸菌の IL-12 p70 誘導能が増強されることが明らかになった。

A. 研究目的

スギ花粉症は国民病とも言われるアレルギー性疾患の一つである。近年、日本スギ花粉症の発症は増加の一途をたどり、深刻な問題となっている。アレルギー性疾患に対する根治的な治療法として、減感作療法が行われてきた。減感作療法は、感作アレルゲン抽出液の皮下投与することでアレルゲンに対する反応性を減少させ、臨床症状の改善を誘導する治療法である。しかしながら、この減感作療法は注射局所の疼痛、アナフィラキシーショック等の副反応を引き起こす可能性があり、その治療効果も満足のいくものではない。こうした背景から、より安全で効果の高い新規免疫療法の開発が求められている。

近年、乳酸菌のアレルギー抑制効果が示され、治療への応用が期待されている。これまでに、腸内細菌叢における乳酸菌数とアレルギー性疾患の発症との関連性は示唆されてきた。Bjorksténらは、エストニアとスウェーデンの2歳児の腸内細菌叢においては、アレルギーを持たない子供と比較して、アレルギー性疾患を有する子供で乳酸菌数が有意に少ないと報告している。Kalliomakiらは、妊娠している母親と出産後の乳児に対してある *lactobacillus* 株を経口投与した結果、アトピー性皮膚炎の臨床症状が軽減したと報告している。in vitro における研究では、*lactobacilli* は Th1 サイトカインである IL-12 産生や樹状細胞の活性化を誘導することが明らかにされてきた。このような乳酸菌の免疫刺激効果が

が注目され、粘膜ワクチンのベクターとして乳酸菌を応用するという研究が行われている。実際に、破傷風菌毒素タンパクや HIV タンパクなどを組み込んだ組換え乳酸菌などが作製され、抗原特異的な液性免疫や細胞性免疫を刺激出来ることが示されている。

我々は、スギ花粉主要アレルゲンである Cry j 1 を発現する組換え乳酸菌を用いた新規免疫療法の開発を目的とし本研究を行った。Cry j 1 を発現する組換え乳酸菌の投与により Cry j 1 特異的 Th1 免疫反応が誘導されスギ花粉に対する症状が改善されるとの仮説のもと、Cry j 1 をコードする cDNA を組み込んだ乳酸菌の作製を試みた。

B. 研究方法

ベクターとして、乳酸菌 : *Lactobacillus casei* (ATCC393) を用いた。この株に対して Cry j 1 全長をコードする cDNA を組み込んだプラスミドベクターをエレクトロポレーション法で導入した。しかし、Cry j 1 の発現は確認されなかったため、既に *L. casei* における発現に成功している LLO との融合タンパクとして発現されるようにデザインしたプラスミドベクターを作製し、*L. casei* に導入した (Fig.1)。本研究では、N末端から 158-329 番目のアミノ酸を含む Cry j 1 (Cry j 1₁₅₈₋₃₂₉; 約 20 kDa) を用いた (Fig.1)。この Cry j 1 はヒトおよび BALB/c マウスの CD4⁺ T 細胞が認識するペプチド断片 (T 細胞エピトープ) を含んでいる。LLO は、*Listeria monocytogenes* の菌

体由来タンパクであり、LLO 自体にマウスの脾臓細胞から IFN- γ , IL-12, および IL-18 などの Th1 サイトカインを誘導することが明らかとなっている。LLO は溶血毒性を有するため、本研究では、溶血毒性をもたらすドメインを欠損させた変異 LLO を用いた。コントロールとして、LLO のみ導入した株と空のベクターを導入した株も作製した。これらの株に関して、Cry j 1 の発現および IL-12 p70 誘導能をマウスの脾臓細胞を用いて検討した。

C. 研究結果

Cry j 1₁₅₈₋₃₂₉ の産生を確認するためにウサギ抗 Cry j 1 血清を用いてウェスタンブロットを行ったがその発現を検出できなかったため、LLO に対する抗体を用いた。抗 LLO 抗体を用いたウェスタンブロット法では、Cry j 1₁₅₈₋₃₂₉-LLO 導入株で約 60kDa のバンドを、LLO 導入株では約 40kDa のバンドを検出した (Fig.2)。この分子量の違いは Cry j 1₁₅₈₋₃₂₉ (20kDa) の分子量と一致することから、導入した Cry j 1₁₅₈₋₃₂₉ は発現していると予想される。また、LLO から Cry j 1₁₅₈₋₃₂₉ にわたるシークエンスを増幅するようにデザインされたプライマーペアを用いた RT-PCR によって、Cry j 1₁₅₈₋₃₂₉ mRNA の発現も確認した (Fig.3)。これらの結果は、この組換え *L.casei* における Cry j 1₁₅₈₋₃₂₉ の発現を示している。このリコンビナント乳酸菌による IL-12 p70 誘導能を BALB/c マウスの脾臓細胞で検討した結果、LLO の発現によって IL-12 の産生が増強されることが明らかとなった (Fig.4)。

D. 考察

本研究においては、スギ花粉アレルゲンの主要抗原である Cry j 1 を組込んだ組換え乳酸菌 (*L.casei*) の作製に成功した。組換え体蛋白を発現する乳酸菌の作製は、大腸菌におけるそれと比較して非常に困難であり、菌株や組込む遺伝子の種類によってその発現は様々である。経験的に、植物タンパクなどを乳酸菌に発現させることは難しいことが解っており、今回の研究でも Cry j 1 全長は発現しなかった。そこで、Cry j 1₁₅₈₋₃₂₉ を、既にその発現に成功している LLO との融合タンパクとして組込むことで、その発現に成功した。植物タンパクの発現に成功したと

いう点においては、成果があったと思われる。

本研究において、LLO の発現により乳酸菌の IL-12 p70 の誘導が増すことが明らかとなった。これは、LLO が有する Th1 サイトカイン誘導能を反映していると考えられる。この IL-12 p70 産生増強は Th2 免疫反応主体のアレルギー性疾患に対して有効である可能性がある。

今回の研究では、*L.casei* (ATCC393) をベクターとして用いたが、*Lacatobacillus* には腸内環境において長期生存が可能な株や、より IL-12 誘導能が高い株などが存在する。今後、このような株でも検討する必要がある。

今後、この組換え乳酸菌に発現している Cry-j 1₁₅₈₋₃₂₉ の抗原性を確認すること、組込んだタンパクの発現量をより増やすことなど課題は多く残されている。これらの課題を克服し、この組み換え乳酸菌の抗アレルギー効果をスギ花粉症モデルマウスで検討したいと考えている。

E. 結論

本研究においては、日本スギ花粉アレルゲンの主要アレルゲンである Cry j 1 の一部を組込んだ組換え乳酸菌の作製に成功した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohmori, K., Sakaguchi, M., Kaburagi, Y., Maeda, S., Masuda, K., Ohno, A. and Tsujimoto, H.: A descriptive study of 85 dogs with suspected allergic reactions after vaccination in Japan. *Veterinary Record* 156,87-88,2005
- 2) Miyazawa, H., Sakaguchi, M., Yasueda, H., Saito, S., Tanaka, K., Nagata, K. and Inouye, S.: Non-IgE,-IgG4 antibody to Japanese cedar pollen allergens: Comparison of its prevalence and titers between pollinosis patients and non-patients. *Allergology International* 54,159-166,2005
- 3) Ohmori, K., Sakaguchi, M., Maeda, S., Masuda, K., Ohno, K., Kaburagi, Y., Kurata, K., DeBoer, D.J. and Tsujimoto, H.: IgE reactivity to vaccine components in dogs that developed immediate-type allergic after vaccination. *Veterinary Immunology*

allergic after vaccination. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 249-256,2005

4) Murasugi, T., Nakagami, Y., Yoshitomi, T., Hirahara, K., Yamashita, M., Tanuguchi, Y., Sakaguchi, M. and Ito, K. : Oral administration of a T cell epitope inhibits symptoms and reactions of allergic rhinitis in Japanese cedar pollen allergen-sensitized mice. *European Journal of Pharmacology*, 510,143-148,2005.

5) Olsen, D., Jiang, J., Chang, R., Duffy, R., Sakaguchi, M., Leigh, S., Lundgard, R., Ju, J., Buschman, F., Truong-Le, V., and Plarek, J.: Expression and characterization of a low molecular weight recombinant human gelatin. *Protein Expression and Purification*, 40,346-357, 2005.

6) Futamura, N., Tani, N., Tsumura, Y., Mukai, Y., Nakajima, N., Sakaguchi, M. and Shinohara, K.: Characterization of genes for novel thaumatin-like proteins in *Cryptomeria japonica*. *Tree Physiology* 26, 51-62, 2006.

2.学会発表

1) Sakaguchi, M., Ohmori, K., Maeda, S., Masuda, K., Ohno, K., Kaburagi, Y., Kurata, K., DJ, DeBoer., Tsujimoto, H. Identification of allergens of vaccine components that induced immediate-type allergic reactions after vaccination in dogs. 61th American Academy of Allergy, Asthma Immunology, Mar 20, 2005, San Antonio, USA

2) 宮沢博, 堤明恵, 西澤智恵, 阪口雅弘, 大砂博之, 池澤善郎, 堀久枝: エビ第2アレルギー(arginine kinase)の抗原性はエビ科間で異なる. 第17回日本アレルギー学会春季大会(2005年6月2日、岡山)

3) 宮沢博, 西澤智恵, 堤明恵, 阪口雅弘, 大砂博之, 池澤善郎: グルマエビの第3アレルギー(Pen j 3)の同定と免疫学的特性の検討. 第55回日本アレルギー学会秋季学術大会(2005年10月20日、盛岡)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

Fig.1 LLO-Cry j 1導入プラスミドベクター

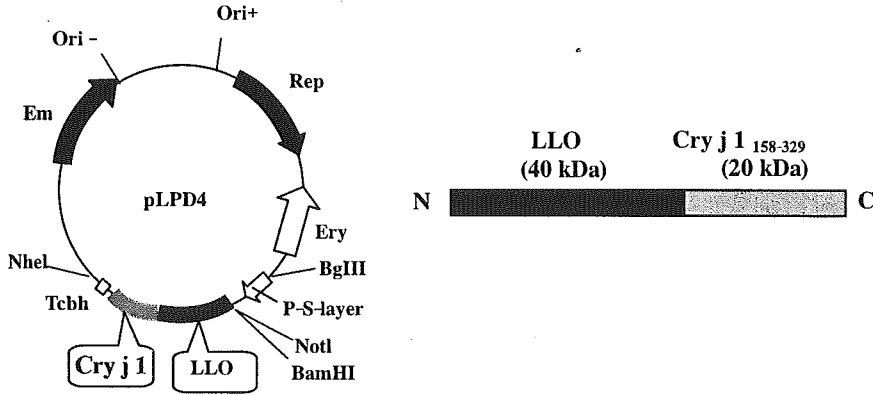


Fig. 2 LLO-Cry j 1タンパク発現の解析

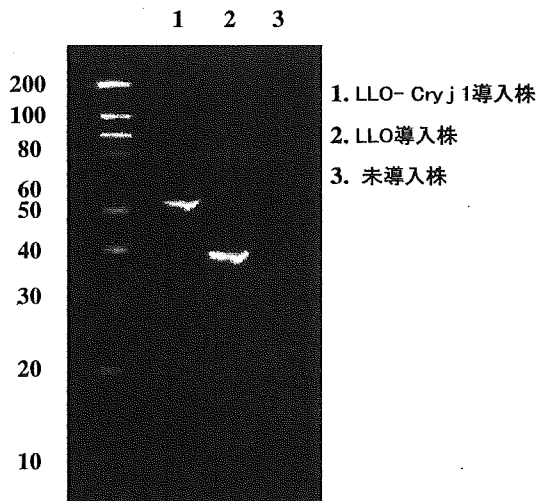


Fig. 3 LLO-Cry j 1 mRNAの発現解析

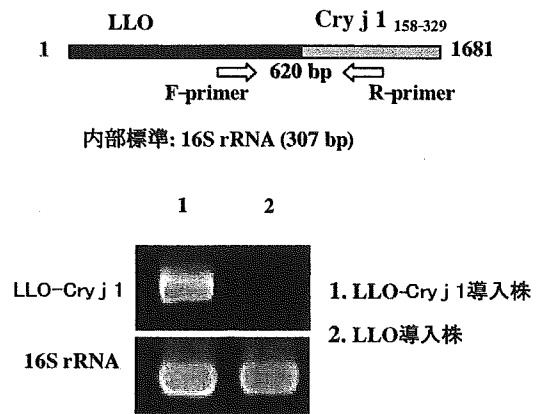
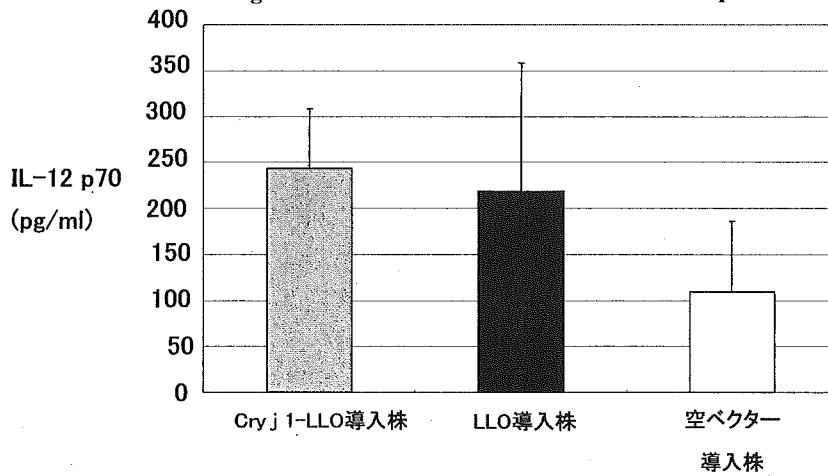


Fig. 4 乳酸菌刺激による脾臓細胞からの IL-12 p70 産生



組換ダニ主要アレルゲン Der p 1 及び Der f 1 の、ヒトタンパク質を基質とした切断活性、
ヒトケラチノサイト活性化能、及びマウスにおけるIgE誘導活性

分担研究者 高井敏朗 順天堂大学大学院医学研究科アトピー疾患研究センター・講師

研究要旨

天然型アレルゲンと同等の構造・活性を保持した活性型組換アレルゲンは、診断および治療、さらに構造解析や疾患との関連解析においても有用性が高い。本年度は、組換型Der f 1およびDer p 1が種々の研究において天然型の代替として使用可能であるかを評価する目的で、天然型Der p 1により切断されることが既に報告されているヒトタンパク質 (CD23/低親和性IgE受容体、CD25/IL-2 α サブユニット、および α 1-antitrypsin) に対する切断活性およびマウスにおけるIgE誘導活性について組換体と天然型の比較を行った。さらに、これまで解明が進んでいなかったケラチノサイトへの作用を検討した。組換型Der f 1およびDer p 1はヒトCD23、CD25および α 1-antitrypsinを切断し、免疫マウスにおいて天然型Der f 1およびDer p 1と同等のIgEを誘導した。組換型Der f 1およびDer p 1刺激によりヒトケラチノサイト培養上清中のIL-8が上昇し、システインプロテアーゼインヒビターの添加によりこれは抑制された。組換型Der f 1およびDer p 1は天然型と同等の構造およびIgE結合能/アレルゲン活性を保持しているだけでなく、プロテアーゼ活性に依存した細胞刺激活性やIgE/Th2誘導活性を保持しているため、機能と疾患の関連における作用点の解析研究においても有用である。

A. 研究目的

「構造」と「機能」を有したタンパク質としてアレルゲンをとらえる視点に立ち、アレルゲン特異的免疫療法 (減感作療法) のための改変型アレルゲンワクチン創製を目的として研究を進めている。ダニ主要グループ1アレルゲンDer f 1及びDer p 1はエキス中含有量、患者感作率、及びIgE結合力価のいずれにおいても高値を示す主要アレルゲンであるが、近年、そのシステインプロテアーゼ活性と疾患発症の関連性を示唆する実験結果が報告されている。昨年度までにDer f 1及びDer p 1の活性型組換体の調製に成功し、アレルゲン活性 (Takai et al., JACI, 2005) 及び合成基質に対するプロテアーゼ活性基質特異性 (Takai et al., BBRC, 2005) における天然型Der f 1及びDer p 1との同等性を明らかにし、さらに酵素活性を標的とした新規変異体の作製に成功した (特許出願)。本年度は、この組換型Der f 1及びDer p 1が種々の*in vitro*及び*in vivo*研究において天然型の代替として使用可能であるかを評価す

る目的で、天然型Der p 1により切断されることが既に報告されているヒトタンパク質 (CD23/低親和性IgE受容体、CD25/IL-2 α サブユニット、及び α 1-antitrypsin) に対する切断活性及びマウスにおけるIgE誘導活性について組換体と天然型の比較を行った。さらに、これまで解明が進んでいなかったケラチノサイトへの作用を検討した。

B. 研究方法

プロテアーゼ活性を保持した組換型Der f 1及びDer p 1は、一昨年度に確立した系を利用して調製した。L-cysteine処理により活性化した組換型Der f 1及びDer p 1のプロテアーゼ活性によるヒトタンパク質切断及びヒトケラチノサイト活性化を調べた。ヒトB細胞株及び末梢血T細胞上のCD23及びCD25の切断はフローサイトメトリーにより解析した。ヒト α 1-antitrypsin標品の切断はSDS-PAGEにより確認した。ヒトケラチノサイト培養上清中のIL-8産生を測定した。アラムと共にマウス腹腔に免疫し、血清中

IgEを測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験は動物実験施設指針に則り実験を行った。

C. 研究結果

組換型Der f 1及びDer p 1はヒトCD23, CD25及び α 1-antitrypsinを切断した。免疫マウスにおいて、組換型Der f 1及びDer p 1は天然型Der f 1及びDer p 1と同等のIgEを誘導した。組換型Der f 1及びDer p 1刺激によりヒトケラチノサイト培養上清中のIL-8が上昇し、システインプロテアーゼインヒビターの添加によりこれは抑制された。

D. 考察

組換型Der f 1及びDer p 1が天然型Der f 1及びDer p 1と同様のヒトCD23, CD25及び α 1-antitrypsin切断活性及びマウスにおけるIgE誘導活性を保持していることを示した (Takai et al., *Int Arch Allergy Immunol*, 2005)。よって、組換型Der f 1及びDer p 1は今後の種々の*in vitro*及び*in vivo*研究において、天然型の代替として使用可能であると考えている。これまで天然型Der p 1のプロテアーゼ活性による種々の細胞の活性化が報告されているが、ケラチノサイト活性化の報告はなかった。組換型Der f 1及びDer p 1を利用し、ヒトケラチノサイトを刺激しうることを初めて示した (Kato et al., *JACI*, 2005)。

E. 結論

組換型Der f 1及びDer p 1は天然型と同等の構造及びIgE結合能/アレルギー活性を保持しており、診断及び治療における標準化抗原として有用である。さらに、プロテアーゼ活性に依存した細胞刺激活性やIgE/Th2誘導活性を保持しているため機能と疾患の関連における作用点の解析研究においても有用である。

F. 健康危険情報

現時点では特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Kato T, Takai T, Mitsuishi K, Okumura K, Ogawa H. 2005. Cystatin A inhibits IL-8 production by keratinocytes stimulated with Der p 1 and Der f 1: Biochemical skinbarrier against mite proteases. *J Allergy Clin Immunol* 116:169-176.
- (2) Nakazawa T, Takai T, Hatanaka H, Mizuuchi E, Nagamune T, Okumura K, Ogawa H. 2005. Multiple-mutation at a potential ligand-binding region decreased allergenicity of a mite allergen Der f 2 without disrupting global structure. *FEBS Lett* 579:1988-1994.
- (3) Takai T, Kato T, Ota M, Yasueda H, Kuhara T, Okumura K, Ogawa H. 2005. Recombinant Der p 1 and Der f 1 with in vitro enzymatic activity to cleave human CD23, CD25, and α 1-antitrypsin, and in vivo IgE-eliciting activity in mice. *Int Arch Allergy Immunol* 137:194-200.
- (4) Takai T, Takaoka M, Yasueda H, Okumura K, Ogawa H. 2005. Dilution-method to refold bacterially expressed recombinant Der f 2 and Der p 2 to exhibit the secondary structure and histamine-releasing activity of natural allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 137:1-8.
- (5) Takai T, Mizuuchi E, Kikuchi Y, Nagamune T, Okumura K, Ogawa H. 2006. Glycosylation of recombinant proforms of major mite allergens Der p 1 and Der f 1 decelerates the speed of maturation. *Int Arch Allergy Immunol* 139:181-187.
- (6) Ichikawa S, Takai T, Inoue T, Yuuki T, Okumura Y, Ogura K, Inagaki F, Hatanaka H. 2005. NMR study on the major mite allergen Der f 2: Its refined tertiary structure,

epitopes for monoclonal antibodies and characteristics shared by ML protein group members. *J Biochem* 137:255-263.

2. 学会発表

- (1) 高井敏朗. 2006, 3月. ダニ抗原の抗原性と変異体を用いた治療戦略. シンポジウム: アレルギーの解明と制御を目指して—遺伝子から機能分子・生体まで—日本薬学会第126年会 (仙台).
- (2) 太田幹子、高井敏朗、加藤武、安枝浩、久原孝俊、武田健、奥村康、小川秀興. 2006, 3月. 組換えダニ主要アレルゲンのヒトCD23, CD25 及び α 1-antitrypsin の切断活性とマウスでの IgE 誘導活性. 日本薬学会第126年会 (仙台).
- (3) 加藤武、高井敏朗、藤村務、松岡裕之、西岡夕子、村山季美枝、石井明、奥村康、小川秀興. 2005, 12月. ダニアレルゲンのプロテアーゼ活性によるケラチノサイトの活性化. 日本免疫学会総会・学術集会 (横浜).
- (4) 高井敏朗、加藤武、光石幸市、畠中秀樹、奥村康、小川秀興. 2005, 10月. シスタチン A 結合は組換えダニ主要グループ1アレルゲンのアレルゲン活性を修飾する. 日本アレルギー学会 (盛岡).
- (5) 高井敏朗、加藤武、太田幹子、安枝浩、久原孝俊、奥村康、小川秀興. 2005, 10月. 組換えダニ主要アレルゲンのヒト CD23, CD25 及び α 1-antitrypsin の切断活性とマウスでの IgE 誘導活性. 日本アレルギー学会 (盛岡).
- (6) 加藤武、高井敏朗、藤村務、松岡裕之、西岡夕子、村山季美枝、石井明、奥村康、小川秀興. 2005, 10月. ダニアレルゲンのプロテアーゼ活性によるケラチノサイトの活性化. 日本アレルギー学会 (盛岡).
- (7) 加藤耕一、隅本尚志、長棟輝行、高井敏朗. 2005, 9月. アレルギー診断のためのマイクロ流路内での好塩基球株細胞内 Ca 変化のイメージ. 日本化学工学会第37回秋季大会 (岡山).
- (8) 西岡夕子、高井敏朗、加藤武、久原孝俊、太田幹子、戸倉智子、光石幸市、奥村康、小川秀興、池田志孝. 2005年, 4月. 組換えダニアレルゲン Der p 1 のプロテアーゼ活性及び高次構造変化による IgE 産生能の変化. 日本研究皮膚科学会第30回年次学術大会・総会 (横浜).
- (9) 太田幹子、高井敏朗、加藤武、久原孝俊、武田健、奥村康、小川秀興. 2005, 3月. 組換えダニ主要アレルゲン Der f 1 のプロテアーゼ活性に依存した IgE 産生と IgE 誘導能を欠く変異体の作製: 新機軸アレルゲンワクチンの提案. 日本薬学会第125年会 (有明・台場).

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

プロテオーム解析によるスギ花粉・ダニアレルゲンの分子群の全容解明、アレルゲンデータベースの構築

分担研究者 小埜和久 広島大学大学院先端物質科学研究科教授

研究協力者 秋 庸裕 広島大学大学院先端物質科学研究科助教授
河本正次 広島大学大学院先端物質科学研究科助手

研究要旨：我々はスギ花粉とダニアレルゲン分子種構成の全容を把握するためにプロテオミクスを駆使した両抗原のアレルゲノームデータベースを作製し、主要抗原以外の IgE 反応頻度を示す未同定重要アレルゲンが多数存在することを明らかにしてきた。本年度は、データベースの更なる充実を目標として同マップ上の新規アレルゲンの同定と免疫生化学的特性評価を前年度に引き続き行くとともに、得られた情報をテラーメイド医療へと応用展開するための基盤技術を整備することを目的とした。スギ花粉抗原解析では、マップ上の2種類の新規アレルゲン、CPA39 および CPA63 の cDNA クローニングに成功した。CPA39 は β -1,3-glucanase に類似したポリペプチドであり、他植物由来の同ファミリーアレルゲンとも高い相同性を示した。一方、CPA63 は aspartyl protease/nucleoid DNA binding protein と相同性を有することがわかった。両抗原の組換え型タンパク質をバキュロウイルス-昆虫細胞分泌発現系にて作製したところ、IgE 結合活性を保持していることが確認された。ダニ抗原解析では、最も IgE 反応頻度の高いスポットが Der f 7 と同定され、Der f 2 もこれに次ぐ高反応性スポットであった。両抗原ともに等電点・分子量の異なる多型を示し、アイソフォームごとに IgE 反応頻度が異なっていた。更に Der f 1, Der f 10 のアサインメントに成功したほか、新規の高反応性アレルゲンも複数見いだされた。

A. 研究目的

スギ花粉症とダニアレルギーは我が国の I 型アレルギー疾患の双壁であり、原因抗原に関する基礎的知見を集積することは効果的な診断・治療法を開発する上でも必須である。本研究ではこれまでに IgE 抗体反応性に基づくアレルゲン分子種構成の全容解明を目標に、スギ花粉ならびにダニ抗原の網羅的解析（アレルゲノーム解析）を実施し、二次元電気泳動上における IgE 反応頻度マップを作製した。その結果、主要抗原以外にも高 IgE 反応性を示す新規アレルゲンが多数存在することを明らかにすると共に、当該アレルゲンの遺伝子単離と特徴付けを進めてきた。本年度はアレルゲンデータベースの更なる充実を図るとともに、これを次世代診断システムの確立やワクチン創薬研究等のテラーメイド医療に資するための基盤技術を整備することを目的とした。

B. 研究方法

スギ花粉あるいはダニ抽出物のアレルゲノームマップ上で高 IgE 反応頻度を示した抗原スポットの部分一次配列を TOF-MS 解析により決定し、データベース解析に供した。新規アレルゲンについては配列情報を元に全長 cDNA を 5'-ならびに 3'-RACE

PCR 法にてクローニングした。当該アレルゲン遺伝子を含む組換えバキュロウイルスを作製し、昆虫細胞 Sf21 を用いた分泌発現・精製系を確立した。得られた組換え型アレルゲンの IgE 結合活性を酵素抗体法 (ELISA) にて評価した。

(倫理面への配慮)

研究対象者には本研究の内容と予想される結果を説明して十分な理解を得た。その後、自由意志による同意を得た上で採血が行われた。個人情報には細心の注意をもって管理された。本研究は鷹の橋中央病院の倫理委員会の承認を得た上で実施された。

C. 研究結果

昨年度までのスギ花粉アレルゲノーム解析にて見いだされた Cry j 2 以上の IgE 反応頻度を有するアレルゲンスポットのうち、47.5%の反応頻度を示したスポット No. 39 および No. 63 をそれぞれ CPA39, CPA63 と命名して TOF-MS 構造解析に供するとともに、全長 cDNA をクローニングした。CPA39 cDNA は 471 アミノ酸をコードしており、植物由来の β -1,3-glucanase と高い相同性を示した。更に同配列は、植物アレルゲンである Ole e 9 (オリーブ花粉)、Hev b 2 (ラテックス) とそれぞれ約 48%および

36%の相同性を示した。CPA63 cDNA は 472 アミノ酸からなり、aspartyl protease/nucleoid DNA binding protein と相同性を有することが判明した。テラーメイド診断に資するための基盤技術整備の足がかりも兼ねて、両抗原のバキュロウイルス-昆虫細胞による分泌発現・精製系を構築した。両組換え型抗原とも His-tag 融合タンパク質として良好な分泌発現を示し、簡便な操作にて最終精製することができた。(図 1)。精製組換え型 CPA39 ならびに CPA63 とスギ花粉症患者 IgE との結合活性を ELISA にて検証した結果、それぞれ 60.7% (17/28)および 33.3% (10/30)の IgE 結合頻度を有することがわかった(図 2, 図 3)。

ダニアレルゲノム解析では、最も反応頻度の高いスポット (85%) が主要抗原 Der f 7 と同定された。Der f 2 もこれに次ぐ高反応性スポットであった。両抗原ともに等電点あるいは分子量の異なる多型を示し、アイソフォームごとに IgE 反応頻度が異なっていた。他の主要抗原では Der f 1, Der f 10 のアサインメントに成功した(図 4)。更に Der f 2 と同じ分子量領域に複数の未知アレルゲンの存在を認めた。このうち 1 つの抗原スポットは、我々が既に同定していた新規アレルゲン Mag133 であった。

D. 考察

今回、新規の主要スギ花粉アレルゲンとして β -1,3-glucanase ホモログである CPA39, aspartyl protease 様分子である CPA63 の同定に成功した。 β -1,3-glucanase はラテックス-果物症候群に関与するパンアレルゲンの可能性が示唆されており、昨年同定した chitinase 同様、CPA39 の交差反応性に興味を持たれる。我々が構造解析のターゲットとした Cry j 2 以上の IgE 反応性を示した他の未知アレルゲンについても cDNA クローニングが完了しつつあり、主要なスギ花粉アレルゲノムの全貌を明らかにすることができたと考えている。ダニアレルゲノム解析では Der f 7 がメジャーアレルゲンであることが浮き彫りとなった。今後、本抗原を診断あるいは治療のターゲットとして考慮していくことが肝要であろう。また Mag133 等の高反応性ダニアレルゲンの発見も重要な知見である。これらの cDNA クローニングも進行中であり、スギ花粉同様、ダニ抗原においても既知の主要抗原グループを補完するデータベース構築への目処がついたと判断している。

今後は両データベースの更なる充実を図りつつ、これら創薬シーズを診断・治療技術へと展開してい

くことが重要である。この点で今回、昆虫細胞系が組換え型スギ花粉アレルゲンの生産に有効であることを明確にできた意義は大きい。これを端緒として、次世代型の分子診断システムの開発あるいは同診断結果に基づいたテラーメイド型ワクチン療法の確立へ向けた検討を進めていく予定である。

E. 結論

新規スギ花粉主要抗原として β -1,3-glucanase と aspartyl protease/nucleoid DNA binding protein を同定した。更にダニアレルゲノムマップ上で主要抗原のアサインメントに成功した。

F. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、血清を分譲して下さいました鷹の橋中央病院院長林鷹治博士に深謝致します。また本研究にご尽力頂きました磯部敏秀氏(本学大学院先端物質科学研究科博士課程前期)に心より感謝の意を表します。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 河本正次、秋庸裕、重田征子、坪井信治、勝谷 隆、林 鷹治、小椋和久 (2005) ダニアレルゲン-分子種構成、分子多型、並びに特異的免疫治療-アレルギー科 19: 549-556.

2) 河本正次、秋庸裕、小椋和久 (2006) プロテオーム解析によるスギ花粉・ダニアレルゲンの全容解明 アレルギー・免疫 13: 340-344.

2. 学会発表

1) 磯部敏秀、秋庸裕、石川信吾、河本正次、重田征子、小椋和久 ダニ *Dermatophagoides farinae* におけるアレルゲノム解析 日本農芸化学会 2005 年度大会 (平成 17 年 3 月 28 日-30 日、札幌)

2) 磯部敏秀、秋庸裕、石川信吾、河本正次、重田征子、泉俊輔、麻奥良子、林鷹治、巖原美穂、小椋和久 ダニ *Dermatophagoides farinae* におけるアレルゲノム解析 第 17 回日本アレルギー学会春期臨床大会 (平成 17 年 6 月 2 日-4 日、岡山)

3) Fujimura T, Shigeta S, Suwa T, Kawamoto S, Aki T, Masubuchi M, Hide M, Ono K (2005) A newly identified class IV chitinase allergen from Japanese cedar pollen shows IgE crossreactivity with latex C-serum. *The XIXth World Allergy Organization Congress* (2005.6.26-7.1, Munich, Germany)

4) Kawamoto S, Baba K, Nakamura N, Tange T, Aki T, Shigeta S, Ono K (2005) Identification of a novel house dust mite allergen that induces Th2 cell polarization. *The XIXth World Allergy Organization Congress* (2005.6.26-7.1, Munich, Germany)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

1) 小埜和久, 重田征子, 秋庸裕, 河本正次, 島田弥生, 力丸智史, 平川雄三, 大磯勲 スギ花粉由来の新規アレルギー 特願2005-36507

2) 小埜和久, 重田征子, 秋庸裕, 河本正次, 島田弥生, 力丸智史, 大西伸和, 大磯勲 スギ花粉由来の新規アレルギー 特願2005-201947

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し